

USO DE VARIÁVEIS RELACIONADAS COM A PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA, EM CAMUNDONGOS, COMO FATORES PREDITIVOS

Mariana Pasquali Marconato Mancini, Bruna Castilho Soto Campanha, Daniela Motta de Souza, Caio Pontes Godoi, Hugo Fernandes, Fernando Frei, Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

*Resultados parcialmente publicados, no formato de resumo, na XX Reunião Anual da SBTE (Guarujá, SP, 2008) e na 8th Transgenic Technology Meeting da ISTT (Toronto, Canadá, 2008).

RESUMO

A superestimulação visando a produção embrionária, em camundongos, é um procedimento multifatorial. Para minimizar o número de animais sacrificados e maximizar o resultado do tratamento superestimulatório, é necessário que haja uma predição do risco de não obter embriões de determinado animal. Este trabalho objetivou avaliar se as variáveis - concentração e horário da administração hormonal, presença de “plug” copulatório e macho utilizado – seriam fatores preditivos na produção embrionária. Camundongas foram distribuídas em quatro grupos (fatorial 2x2), com o tratamento superovulatório iniciado às 13h ou às 17h e os hormônios (eCG e hCG) administrados com 5 ou 10UI. Após o hCG, os animais foram colocados com machos para a cópula. Na manhã seguinte foi verificada a presença de “plug” (D0,5). A recuperação dos embriões foi realizada entre D2,5 e D4,5, mediante lavagem dos ovidutos e cornos uterinos. As estruturas recuperadas (ETO) e os embriões viáveis (EVI) foram morfológicamente classificados. A porcentagem de EVI, em relação às ETO, foi considerada taxa de viabilidade embrionária (TVE). Os grupos foram comparados com a significância sendo considerada quando $p < 0,05$. Não houve diferença significativa entre os grupos ou quando os efeitos principais (horário e concentração hormonal) foram analisados. A TVE diferiu significativamente, quanto à presença ou não do “plug” e quanto aos machos utilizados. Foi concluído que nem a concentração hormonal, nem o horário de sua administração - ou sua associação - foram significativos como fatores preditivos para a produção de embriões. Entretanto, a presença de “plug” foi significativamente relacionada com um aumento da TVE.

Palavras-chave: superestimulação ovariana; produção de embriões; concentração hormonal; horário de administração; camundongo.

UTILIZATION OF VARIABLES RELATED TO MICE EMBRYO PRODUCTION AS MARKERS

ABSTRACT

Mouse embryo production by superstimulation is a multifactorial process. To minimize the number of sacrificed animals and to maximize the results of the superstimulatory treatment, it should be possible to predict the risk of do not get embryos from such a treated animal. This work aimed to evaluate if the variables - hormone concentration and the timing of its administration, the copulatory plug presence and individual male used to mating – could be predictive factors on the mouse embryo production. Females were distributed in four groups (cross-over design) related to scheduled superstimulation treatment (1300h or 1700h) and eCG/hCG administered concentration (5 or 10IU). After the hCG treatment, females were put to mate. On the next morning it was verified the presence of a copulatory plug (D0.5). Embryo recovery was performed from D2.5 to D4.5 by flushing the oviducts and uterine horns. Total structures recovered (TSR) and the viable embryos (VE) were classified by its morphology. Viability rate (VR) was calculated with VE in relation to TSR ($\times 100$). Group comparison was analyzed with 5% of significance. There were no significant differences among groups, even when only main effects were analyzed (hormone concentration and timing of its administration). There was significant difference in VR from animals with or without plug and from the worst and best males used. It was concluded that neither the hormone concentration nor timing of its administration - or their association – was significant as predictive factors for the embryo production. However, the plug presence was related to higher VR.

Keywords: superovulation; embryo production; hormone concentration; treatment scheduling; mouse.

INTRODUÇÃO

A biotecnologia da reprodução foi uma das áreas cujo desenvolvimento neste último século resultou em grande impacto para a sociedade devido sua aplicação na medicina humana e animal (WOHLRES-VIANA et al., 2006).

Este desenvolvimento foi resultado de estudos em modelos experimentais, como o camundongo, o qual é o modelo mais utilizado nas pesquisas científicas relacionadas à reprodução, devido aos fatos de possuírem similaridades fisiológicas, anatômicas, reprodutivas, comportamentais, patológicas e metabólicas a outros mamíferos (BRADLEY, 2002; BAPTISTA et al., 2005).

Para a maioria das pesquisas de técnicas reprodutivas, as quais requerem a obtenção de oócitos ou de embriões, utiliza-se a ferramenta de superestimulação mediante a administração de gonadotrofinas, a qual sofreu significativos progressos na última década, de modo que, atualmente, ela é intensamente pesquisada e empregada com bastante sucesso em diversas espécies (MCLAREN; MICHIE, 1959; OLIVEIRA et al., 2007). A superestimulação em camundongos é utilizada visando três objetivos principais: o de garantir a colheita de estruturas na fase de desenvolvimento de interesse; o de aumentar o número de oócitos ou de embriões fornecidos por ciclo da fêmea, assim também diminuindo o número de animais utilizados e sacrificados; e diminuir os custos de manejo animal e de biotério, por requerer menor quantidade de animais à disposição (BAPTISTA et al., 2005). A superestimulação tem, portanto, bases técnicas, éticas e econômicas.

O protocolo mais consagrado de superestimulação é o que utiliza a combinação das gonadotrofinas coriônicas equina (eCG) e humana (hCG), com um intervalo de 46 a 48 horas entre a administração das duas. Uma resposta ótima da taxa ovulatória está relacionada a

diversos fatores, como concentração e horário de administração dos hormônios, estados fisiológico (idade, fase do ciclo estral, etc), nutricional e sanitário, linhagem, agentes estressores ambientais, bem como características individuais dos animais. Nem todos esses fatores estão padronizados, existindo, portanto, a necessidade do aperfeiçoamento desses protocolos (TARÍN et al., 2002; NAGY et al., 2003).

Assim, com esse trabalho, objetivou-se avaliar os efeitos da concentração e do horário da administração hormonal, do macho usado para a cobertura, e da presença de “plug” copulatório como fatores preditivos na produção de embriões em camundongas sob tratamento superestimulatório.

MÉTODOS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*, linhagem Swiss Webster) alocados no biotério central da Faculdade de Ciências e Letras de Assis (FCL, Unesp) e, previamente, ambientados a ele. O biotério desta instituição é do tipo convencional e dispõe de ventilação, bem como de controle da temperatura ($21\pm1^{\circ}\text{C}$), da iluminação (80 lux), e do fotoperíodo (ciclos claro/escuro de 12 horas). Os animais foram distribuídos em gaiolas translúcidas de polipropileno com dimensões de 30x20x13 cm, e receberam (*ad libitum*) ração Purina® e água. Os machos foram mantidos em gaiolas isoladas e as fêmeas em grupos de, no máximo, 5 animais por gaiola.

O presente trabalho está incubado nos projetos de iniciação científica (MPMM) e de jovem pesquisador (MFGN), ambos aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa na FCL, Unesp (Processos nº 1049/2007 e 897/2007, respectivamente) e seguiu as orientações e os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

(Cobea) e do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV).

Fêmeas prepúberes (n=48), com idade variando entre 30 e 45 dias, foram distribuídas, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais (n=12/grupo). O tratamento superestimulatório foi iniciado em momentos aleatórios do ciclo estral, mediante a administração (via intraperitonal e em volume de 0,1mL) de eCG (Folligon®, Intervet, Boxmeer, Netherland; D-3), e, após 48h, de hCG (Chorulon®, Intervet; D-1) em horários segundo os grupos experimentais; G1 e G2 (às 13h) e G3 e G4 (às 17h). Para os grupos G1 e G3, as concentrações de eCG e de hCG foram de 5UI, enquanto para os grupos G2 e G4 as concentrações (eCG e hCG) foram de 10UI.

Em todos os grupos, imediatamente após a administração da hCG, cada uma das fêmeas foi colocada com um macho fértil - isto é, que havia previamente acasalado e produzido embriões viáveis - assim permanecendo até às 7h do dia seguinte (D0,5), quando machos e fêmeas foram separadas e a cobertura foi detectada pela observação do “plug” copulatório segundo Murer *et al.* (2001). Cada macho cobriu, pelo menos uma vez, fêmeas de todos os grupos experimentais.

Para a recuperação das estruturas totais (ETO), as fêmeas foram sacrificadas por deslocamento cervical entre D2,5 e D4,5 pós cobertura e seus ovidutos e cornos uterinos foram lavados com solução salina fosfatada tamponada (PBS com 0,4% de albumina sérica bovina; Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil). O lavado foi avaliado sob microscópio estereoscópico para a localização das ETO, as quais foram classificadas morfológicamente como embriões viáveis (EVI) ou não viáveis (embriões degenerados e não fertilizados), segundo os critérios preconizados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). A relação entre o número de EVI dividido

pelo de ETO (x100) foi considerada como a taxa de viabilidade embrionária (TVE).

Os dados originais (sem quaisquer transformações) foram analisados mediante os testes de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, ou exato de Fisher, dependendo das variáveis analisadas e de sua normalidade, com a significância sendo considerada quando $p < 0,05$. Quando possível, os dados foram agrupados para comparações entre efeitos principais (horário ou concentração hormonal), fator plug copulatório (presença ou ausência) e macho utilizado para a cópula (variação do indivíduo). Tais agrupamentos foram realizados quando não havia diferença significativa entre os grupos experimentais ou quando foi desejado isolar uma variável independente (plug ou macho) e compará-la com relação às variáveis dependentes (ETO, EVI e TVE).

RESULTADOS

Os resultados relacionados à produção de estruturas totais (ETO), de embriões viáveis (EVI) e a taxa de viabilidade embrionária (TVE), estão dispostos na Tabela 1. A produção de EVI, em cada grupo experimental, está disposta no gráfico da Figura 1.

TABELA 1 – Produção de estruturas totais (ETO) e de embriões viáveis (EVI) e taxa de viabilidade embrionária (TVE) nos grupos experimentais [mediana (1° - 3° quartis)]. 5 ou 10UI (unidades internacionais de eCG e de hCG administradas nas doadoras). 13 ou 17h (horário de administração dos hormônios)

Grupo	Mediana (1°-3° quartis)		
	ETO	EVI	TVE
G1 (5UI, 13h)	12,5 (4,5 - 19,5)	5,0 (0,0 - 10,5)	73,9% (20,0 - 90,0)
G2 (10UI, 13h)	13,5 (6,5 - 23,5)	12,0 (2,0 - 19,0)	90,4% (75,0 - 100,0)
G3 (5 UI, 17h)	11,5 (1,5 - 17,5)	6,5 (0,0 - 13,0)	61,1% (0,0 - 97,1)
G4 (10 UI, 17h)	3,5 (0,0 - 16,0)	0,0 (0,0 - 6,0)	44,4% (8,3 - 91,6)

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (Teste de Kruskal-Wallis, $P>0,05$).

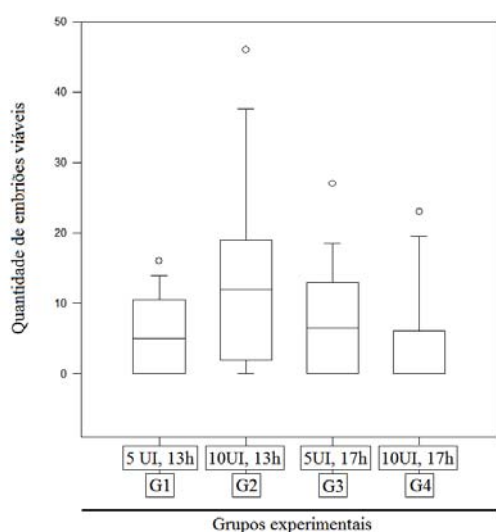


FIGURA 1 - Produção de embriões viáveis (EVI) nos grupos experimentais. Não houve diferença estatística significativa (Teste de Kruskal-Wallis, $P>0,05$)

Uma vez que não houve diferença estatística significativa entre os grupos, os dados foram agrupados, de modo a comparar somente o efeito principal, como horário (13h *versus* 17h) ou concentração do hormônio administrado (5UI *versus* 10UI) na produção de ETO e de EVI, bem como na TVE. Não houve diferença estatística

significativa quanto aos efeitos principais e os resultados obtidos nessa análise estão dispostos na Tabela 2.

TABELA 2 – Efeito principal do horário (13h *versus* 17h) ou da concentração do hormônio administrado (5UI *versus* 10UI) na produção de estruturas totais (ETO) e de embriões viáveis (EVI), e na taxa de viabilidade embrionária (TVE)

Efeito principal	Mediana (1°-3° quartis)		
	ETO	EVI	TVE
13 horas	13,5 (6,0 - 22,0)	8,5 (0,0 - 12,5)	75,0% (0,0 - 97,9)
17 horas	4,0 (0,5 - 17,5)	0,5 (0,0 - 12,0)	16,6% (0,0 - 85,2)
5 UI	11,5 (1,5 - 17,5)	5,0 (0,0 - 12,5)	51,0% (0,0 - 89,1)
10 UI	10,5 (0,0 - 18,5)	4,0 (0,0 - 13,5)	38,9% (0,0 - 95,3)

Não houve diferença estatística significativa dos efeitos principais na produção de ETO ($P=0,201$) e de EVI ($P=0,220$; Teste de Mann-Whitney).

Quando os dados foram reagrupados de modo a compararem a presença e ausência de “plug” copulatório, não houve diferença significativa para a produção de ETO ou de EVI ($p>0,05$, teste de Mann-Whitney). No entanto, houve diferença significativa ($p=0,03$, teste de Mann-Whitney) nas medianas da TVE, quando o plug estava presente [76,5 (0,0-100,0)] ou ausente [0,0 (0,0-73,8)]. Quanto ao efeito principal do horário de administração dos hormônios, foram observados 70,8% (13h) e 33,3% (17h) de plug copulatório nos animais.

A TVE dos machos (taxa geral de viabilidade embrionária entre todas as fêmeas cobertas por determinado macho) foi elaborada no formato de ranking. Quando a TVE (média±dp) dos três piores machos desse ranking (<35%) foi comparada com a do três melhores (>80%), houve diferença estatística ($p=0,001$, teste t). Entre esses dois grupos de machos (os três melhores e

piores), não houve diferença quanto a presença de plug copulatório ($p=0,438$, teste t). Como análise descritiva, a distribuição dos machos em que houve baixa (em menos de 25% das fêmeas), média (em 50% das fêmeas), média-alta (em 60% das fêmeas) e alta (>75% das fêmeas) detecção do plug copulatório, foi de 20, 30, 30 e 20%, respectivamente. Quando os machos foram divididos em dois grupos, quanto à baixa ou à alta produção de plug (isto é, < ou > que 50%, respectivamente), a mediana da TVE resultante diferiu estatisticamente ($p=0,044$, teste de Mann-Whitney).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, não foi observado efeito - isolado ou da interação - das variáveis horário de administração (13 ou 17h) e concentração do hormônio administrado (5 ou 10UI), na produção total de estruturas e de embriões viáveis, assim como na taxa de viabilidade embrionária. O único fator preditivo determinado, com significância estatística, foi o efeito positivo da presença de plug copulatório na média da taxa de viabilidade embrionária.

A interação entre o horário de administração e a concentração do hormônio administrado não produziu diferença estatística quando os grupos foram comparados entre si, quanto a produção de estruturas totais (ETO), de embriões viáveis (EVI) ou na taxa de viabilidade embrionária (TVE). Embora no G4 (10UI/17h) tenha ocorrido uma diminuição numérica nas estruturas (ETO, EVI e TVE; Figura 1), este não foi o resultado obtido por TARÍN et al. (2002). Esses autores, ao utilizarem 10 UI no horário das 17h30, obtiveram o melhor resultado para animais híbridos F1, oriundos de fêmeas C57Bl/6Jlco com machos CBA/Jlco. Os autores justificaram os resultados baseados em que esse horário seria o melhor para controlar precisamente o momento da ovulação (evitando a interferência do pico

endógeno preovulatório de LH). Contudo, vários autores sugerem diferentes protocolos (com variações de horário e de concentração hormonal), com a mesma justificativa: 2,2UI às 12h (COUSE et al., 1999); 5UI às 12h (TANG; WEST, 2000); 5UI às 13h (TAKETO et al., 1991); 5UI às 15h30 (LAWITTS; BIGGERS, 1991); 5UI às 17h (VAN DER AUWERA; D'HOOGHE, 2001); 7,5UI às 12h (ROBERTS et al., 2005); e 10 ou 20UI às 12h (WANG et al., 2001). A maioria das linhagens, descritas nesses trabalhos, responde bem ao tratamento quando 5UI de eCG e de hCG são administradas, mas, para outras linhagens, segundo Nagy et al. (2003), a concentração ideal pode ser mais baixa (2,5UI) ou até mais alta (10UI). No presente trabalho, houve um aumento numérico (mas não estatístico) na produção de embriões viáveis no Grupo 2 (10UI, 13h; Figura 1). Esse aumento, contudo, pode ser devido à concentração de hormônio utilizada, ao horário de sua administração, ou à interação desses dois fatores.

Na análise dos efeitos principais - isto é, sem considerar a interação de ambas variáveis - dos dados agrupados, por horário de administração ou por concentração dos hormônios, não houve diferença estatística na produção de ETO, EVI e TVE. Esse resultado poderia ser explicado pela amplitude da variação, na concentração hormonal e no horário do tratamento, estar dentro de uma faixa eficaz de produção de embriões, para a linhagem utilizada. Essa possível eficácia, entretanto, não impede que haja uma grande variabilidade individual na produção embrionária dos animais superestimulados, conforme já descrito por Baptista et al. (2005). A variabilidade é causada por diversos fatores, tais como, estação do ano, idade da fêmea, fase do ciclo estral, dose e tipo de hormônio administrado, além da variação genética das fêmeas de colônias exogâmicas ("outbreed"). Neste caso, a resposta ovariana às gonadotrofinas

difere entre fêmeas de uma mesma população, sendo que as respostas, ao tratamento, variam entre pobre, intermediária e excelente. Tal variabilidade é, em grande parte, de fundo genético, como demonstrado pelas diferentes respostas aos tratamentos superestimulatórios entre espécies e linhagens de animais de laboratório e domésticos (SPEAROW; BARKLEY, 1999). O fotoperíodo utilizado no biotério influencia, diretamente, o horário preferencial para a administração do hormônio (NAGY et al., 2003). Trabalhos descrevem biotérios com ciclos claro/escuro de, respectivamente, 14/10h (SPINDLE; GOLDSTEIN, 1975; TAKETO et al., 1991; BURRUEL et al., 1996; BARBOSA et al., 2009) ou de 12/12h (COUSE et al., 1999; TANG; WEST, 2000; ERTZEID; STORENG, 2001). Para um confiável controle da ovulação nas doadoras, é preciso que sua indução com hCG – a qual induz a ovulação entre 10 e 13 horas após sua administração - seja anterior ao próprio pico endógeno de LH. Este ocorre, em média, 15 a 20 horas após a metade do segundo ciclo escuro após a administração do eCG (D-3; NAGY et al., 2003) e, no caso do presente trabalho, entre 16 e 21 horas do D-1 (administração do hCG). Em parte, isto poderia explicar o aumento numérico da produção embrionária no grupo 2 (hCG administrado às 13h) - provavelmente, o hCG precedeu o pico endógeno de LH - quando comparada com a do grupo 4 (hCG às 17h).

Quando os dados foram agrupados quanto a presença ou ausência, do plug copulatório nas doadoras, houve diferença entre as médias da taxa de viabilidade embrionária (TVE). O plug é a coagulação do líquido seminal na vagina, sendo que sua visualização indica uma cópula bem sucedida (ERTZEID; STORING, 2001) e sua função é prevenir a perda retrógrada de espermatozoides, aumentando as chances de que eles atinjam o útero (MURER et al., 2001). Entretanto, a detecção do plug não garante a

ocorrência da fertilização ou da gestação (ERTZEID; STORING, 2001). Os resultados do presente trabalho corroboram que a presença do plug copulatório, apesar de não garantir a fertilização, está - significativamente e positivamente - relacionada a altas taxas de viabilidade embrionária. Essa predição positiva do plug é função da constatação física de que ocorreu a cópula. A presença do plug não foi um fator preditivo para a produção total de estruturas (ETO) ou de embriões viáveis (EVI), fato este muito mais relacionado com a resposta da fêmea ao tratamento superestimulatório (SPEAROW; BARKLEY, 1999; BAPTISTA et al., 2005) do que com a constatação, em si, da ocorrência da cópula. A taxa de plug copulatório observado - em função do horário de administração dos hormônios e independente de suas concentrações - foi de 70,8 e 33,3% (às 13 e 17h, respectivamente). O aumento numérico dos embriões viáveis e da TVE no horário das 13 horas (Tabela 2) poderia, ao menos em parte, ser explicado pela alta taxa de plug observado neste horário e, por sua vez, pela relação do plug com maiores taxas de viabilidade (isto é, com a maximização da fertilização). Spindle e Goldstein (1975), contudo, obtiveram 66% de taxa de plug com um protocolo de administração entre 15 e 17h (5UI de hormônios). Em contraste, o grupo 3 (5UI, 17h), do presente trabalho, produziu apenas a taxa de 25% de plug copulatório, demonstrando o mecanismo multifatorial (além do horário e da concentração hormonal) envolvido em sua produção.

O fator individual do macho utilizado influencia, diretamente, a produção de embriões viáveis pela doadora superestimulada. Em decorrência disso, há a necessidade de conhecer, previamente, seu histórico reprodutivo (NAGY et al., 2003; BAPTISTA et al., 2005). Este trabalho corroborou que os machos utilizados são uma importante fonte de variação nos resultados, pois, ao serem comparados os três piores e os três

melhores machos, quanto a TVE geral das fêmeas por eles cobertas, foi observada a taxa de 35,8%±12,9 e de 80,0%±7,8, respectivamente. Esta diferença não foi relacionada com a presença do plug copulatório, uma vez que não houve diferença, nesse quesito, entre esses dois grupos. Estes dados corroboram com Pang et al. (1979) com relação a produção de plug não ser o único fator de avaliação do macho utilizado, uma vez que machos inférteis podem produzir plug e vice-versa. No presente trabalho, o efeito individual dos machos, na variabilidade observada, foi minimizado devido ao desenho dos grupos experimentais, isto é, cada um dos machos copulou com fêmeas provenientes de todos os grupos (delineamento em fatorial 2x2 ou em blocos completos).

Foi concluído que, nas condições deste experimento, não houve efeito - isolado ou em associação - da concentração hormonal (5 ou 10UI) e do horário de sua administração (13h ou 17h) sobre a produção de estruturas totais e de embriões viáveis, bem como na taxa de viabilidade embrionária, em camundongos. Houve um aumento numérico (não significativo) no número de embriões viáveis oriundos do tratamento com 10UI de hormônios administrados às 13 horas. A presença do plug copulatório foi o único fator preditivo – significativo e positivo – relacionado com a taxa de viabilidade embrionária. Os machos utilizados foram uma importante fonte de variação na produção de plug e de embriões viáveis, devendo ser preferencialmente utilizados aqueles com prévio histórico reprodutivo de alta taxa de viabilidade embrionária (uma vez que esta não está, necessariamente, relacionada com a produção de plug copulatório).

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro da FAPESP pelo auxílio (processo 2006/06491-2, MFGN) e bolsas

concedidas (processos 2007/07705-9, MFGN, e 2007/04291-9, MPM).

Aos funcionários da FCL - Assis: Irani Alves dos Santos; Jean Carlos da Silva e José Gilberto Millani.

Os autores declaram não haver qualquer potencial conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade deste trabalho científico.

REFERÊNCIAS

- BAPTISTA, L. P. C.; LANGE, M. C.; RODRIGUES, J. L. Variabilidade na produção de embriões de *Mus domesticus domesticus*. **Ars Veterinária**, v. 21, p. 101-108, 2005. Disponível em: <<http://www.arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/view/50>>. Acesso em: 10 ago. 2009.
- BARBOSA, L. P. et al. Qualidade embrionária de camundongos (*Mus musculus*) suplementados com geléia real. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, p. 146-52, 2009, Disponível em: <<http://www.rbspa.ufba.br>>. Acesso em 02 set. 2009.
- BRADLEY, A. Mining the mouse genome. **Nature**, v. 420, p.512-514, 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v420/n6915/full/420512a.html>>. Acesso em 19 jan. 2009.
- BURRUEL, V. R.; YANAGIMACHI, R.; WHITTEN, W. K. Normal Mice Develop from Oocytes Injected with Spermatozoa with Grossly Misshapen Heads. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 709-14, 1996. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/content/55/3/709.abstract?ck=nck>>. Acesso em: 22 set. 2009.
- COUSE, J. F. et al. Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor-a knockout mouse. **Endocrinology**, v. 140, p. 5855-65, 1999. Disponível em: <<http://endo.endojournals.org/cgi/content/abstract/140/12/5855>>. Acesso em: 22 set. 2009.

- ERTZEID, G.; STORENG, R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. **Human Reproduction**, v. 16, p. 221-25, 2001. Disponível em: <<http://humrep.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/16/2/221>>. Acesso em: 21 set. 2009.
- LAWITTS, J. A.; BIGGERS, J. D. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, p. 543-56, 1991. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/cgi/content/abstract/91/2/543>>. Acesso em: 21 set. 2009.
- MCLAREN, A.; MICHIE, D. Superpregnancy in the mouse: implantation and foetal mortality after induced superovulation in females of various ages. **Journal of Experimental Biology**, v. 36, p. 281-84, 1959.
- MURER, V. et al. Male fertility defects in mice lacking the serine protease inhibitor protease nexin-1. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 98, p. 3029–33, 2001. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/98/6/3029.abstract>>. Acesso em: 29 set. 2009.
- NAGY, A. et al. **Manipulating the Mouse Embryo - A Laboratory Manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- OLIVEIRA, J. L. S. et al. Superovulação em bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 08, 2007. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria08/revisao/03.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2009.
- PANG, S. F.; CHOW, P. H.; WONG, T. M. The role of the seminal vesicles, coagulating glands and prostate glands on the fertility and fecundity of mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, p. 129-32, 1979. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/cgi/content/abstract/56/1/129>>. Acesso em: 29 set. 2009.
- ROBERTS, R. et al. Follicle-stimulating hormone affects metaphase i chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocytes matured in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 107-18, 2005.
- SPEAROW, J. L.; BARKLEY, M. Genetic Control of Hormone-Induced Ovulation Rate in Mice. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 851-56, 1999. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/content/61/4/851.abstract>>. Acesso em: 22 set. 2009.
- SPINDLE, A. I.; GOLSTEIN, L. S. Induced ovulation in mature mice and developmental capacity of the embryos in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 133-16, 1975. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/cgi/content/abstract/44/1/113>>. Acesso em: 10 ago. 2009.
- TAKETO, M. et al. FVB/N: An inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. **Proceedings of National Academy of Sciences**, USA, v. 88, p. 2065-69, 1991. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/88/6/2065.abstract>>. Acesso em: 28 set. 2009.
- TANG, P.; WEST, J. D. The effects of embryo stage and cell number on the composition of mouse aggregation chimaeras. **Zygote**, v. 8, p. 235-43, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014503>>. Acesso em: 10 out. 2006.
- TARÍN, J. J. et al. Stage of the Estrous Cycle at the Time of Pregnant Mare's Serum Gonadotropin Injection Affects Pre-Implantation Embryo Development In Vitro in the Mouse. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 312-319, 2002.
- VAN DER AUWERA, I.; D'HOOGHE, T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. **Human Reproduction**, v. 16, p. 1237-43, 2001. Disponível em:

<<http://humrep.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/16/6/1237>>. Acesso em: 04 set. 2009.

WANG, H. et al. Superovulation, fertilization and in vitro embryo development in mice after administration of an inhibin-neutralizing antiserum. **Reproduction**, v. 122. p. 809-816, 2001. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/cgi/content/abstract/122/5/809>>. Acesso em: 22 set. 2009.

WOHLRES-VIANA, S. et al. Avaliação da recuperação e morfologia em embriões de camundongos (*Mus musculus*) da linhagem suíço produzidos com diferentes protocolos superovulatórios. In: SEMANA DE BIOLOGIA, 29., MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 12., Juiz de Fora, MG, 2006. **Anais...** Juiz de Fora. 2006.